Bochum 1981.

UNTERSUCHUNGEN ZUR DESMALEN OSSIFIKATION AN AUSGESUCHTEN KNOCHENSTRUKTUREN DES HAMSTERSCHÄDELS MIT HILFE VON ^{3}H - GLYCIN

FRANZ-JOSEF SCHMIDT

1981

UNTERSUCHUNGEN ZUR DESMALEN OSSIFIKATION AN AUSGESUCHTEN KNOCHENSTRUKTUREN DES HAMSTERSCHÄDELS MIT HILFE VON ^{3}H - GLYCIN

Der medizinischen Fakultät
der Ruhr-Universität Bochum
vorgelegte Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines Dr. med.

von
Franz-Josef Schmidt
aus Rheinhausen,
jetzt Duisburg

Aus der H N O - Abteilung der Ruhr - Universität Bochum

Vorstand: Professor Dr. med. Henning Hildmann

UNIV. LEIDEN BIBL.

Dekan: Professor Dr. H. Viefhues
Referent: Professor Dr. H. Hildmann
Koreferent: Professor Dr. K. Morgenroth
Tag der mündlichen Prüfung: 18. März 1981

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1	Einführung.....	3
1.1	Einleitung.....	4
1.2	Desmale Ossifikation.....	6
1.3	Die Entwicklung einzelner desmal entstehender Knochen.....	8
1.3.1	Knochen des Schädeldaches.....	8
1.3.1.1	Die Parietalknochen.....	8
1.3.1.2	Die Frontalknochen.....	9
1.3.2	Der Gesichtsschädel.....	9
1.3.3	Der Unterkiefer.....	9
1.4	Autoradiographie mit ^{3}H - Aminosäuren und Allgemeines.....	11
1.5	Autoradiographieergebnisse nach Applikation von ^{35}S - Sulfat.....	13
2	Problemstellung.....	14
3	Material und Methode.....	17
4	Eigene Beobachtungen.....	19
4.1	Markierung der Zellen und Osteoidproduktion.....	20
4.2	Beobachtungen aus den einzelnen untersuchten Regionen.....	23
4.2.1	Bereich des sich entwickelnden Schädeldaches.....	23
4.2.1.1	Histologische Befunde.....	23
4.2.1.2	Verteilung der Markierung...	23
4.2.2	Lateraler Teil des knöchernen Orbitarandes.....	24
4.2.2.1	Histologische Befunde.....	24
4.2.2.2	Verteilung der Markierung...	24
4.2.3	Die knöcherne Struktur einer Schneidezahnalveole des Unterkiefers.....	25
4.2.3.1	Histologische Befunde.....	25
4.2.3.2	Verteilung der Markierung...	26

		Seite
4.2.4	Die Ossifikation des im Unterkiefer auftretenden Sekundärknorpels.....	28
4.2.4.1	Histologische Befunde.....	28
4.2.4.2	Verteilung der Markierung...	30
5	Ergebnisse und Diskussion.....	32
5.1	Ergebnisse, die sich aus der Markierung der Zellen und des Osteoids ableiten lassen.....	33
5.2	Schädeldach.....	36
5.3	Lateraler Teil des knöchernen Orbitarandes.....	37
5.4	Die knöcherne Struktur einer Schneidezahnalveole des Unterkiefers.....	38
5.5	Die Ossifikation des im Unterkiefer auftretenden Sekundärknorpels.	40
6	Zusammenfassung.....	43
7	Literaturverzeichnis.....	46

E I N F Ü H R U N G

1.1 Einleitung

Mit Hilfe der Autoradiographie sind Ossifikationsvorgänge im Rahmen der enchondralen Ossifikation von vielen Autoren eingehend untersucht worden (AMPRINO 1955, CARNEIRO und LEBLOND 1959, GREULICH 1956, KOBURG 1962, LEBLOND und WEINSTOCK 1972, TONNA, CRONKITE und PAVELEC 1962 und 1963, TONNA 1965, TONNA und PAVELEC 1971). Wenige Untersuchungen gibt es hingegen über die Ossifikationsvorgänge der desmalen Knochenentwicklung. MORRIS et al. (1975) beschäftigen sich in ihrer elektronenmikroskopischen Untersuchung mit der Kollagenproduktion durch Osteoblasten aus der Schädelkalotte von Hühnerembryonen. Sie beschreiben mit Hilfe der Autoradiographie den zeitlichen Ablauf, in dem markiertes Material über den einzelnen Zellorganellen beziehungsweise später auch in der Interzellularsubstanz auftaucht. YOUNG (1962) verfolgt in seiner Arbeit das postnatale Wachstum des Parietalknochens einer Ratte, während TONNA (1975) das Markierungsverhalten der Zahnalveole des ersten Molars einer Maus beschreibt.

Diese Arbeiten regten uns an, die desmale Knochenentwicklung in einer ausschließlich auf diese Verknöcherungsprozesse zugeschnittene Studie ausführlich zu untersuchen. Für die Untersuchung wählten wir Hamster, da es leicht zu pflegende Laboratoriumstiere sind mit genügend großen Knochenstrukturen. Speziell untersuchten wir den Schädel des Hamsters, bei dem die meisten Knochenstrukturen desmaler Genese sind. An verschiedenen Bindegewebsknochen des Hamsters befaßten wir uns mit der desmalen Ossifikation in dem Zeitraum vom Neugeborenenalter bis hin zum Jugendlichen- beziehungsweise Erwachsenenalter, so wie sie sich mittels der Autoradiographie darstellt. Zur Markierung wählten wir ^{3}H -Glycin, da Glycin nach NEUBERGER und SLACK (zitiert nach TONNA, CRONKITE und PAVELEC 1963) bevorzugt in Kollagen eingebaut wird, wenn man es

Tieren appliziert. Kollagen wiederum macht 96% der fettfreien organischen Materie des Knochens aus (TONNA et al. 1963). Somit ergab sich die Möglichkeit, mittels des applizierten ^{3}H -Glycin mit Einschränkung die Kollagenproduktion der Knochenzellen zu beobachten.

Die Untersuchung am Hamster erwies sich auch deshalb als vorteilhaft, weil er in bezug auf das Skelettsystem in einem embryonalen Zustand geboren wird (STEPHENS 1972). Nur an den letzten vier Tagen vor der Geburt entwickelt sich intrauterin das Skelettsystem (BEATTY 1950). Hieraus ergibt sich, daß ein großer Teil der Entwicklung des Skelettsystems extrauterin stattfindet. Einige Knochen, die Pars petrosa des Felsenbeins und die Lamina cribrosa des Os ethmoidale, werden sogar erst während der ersten postnatalen Woche angelegt (BEATTY 1950). Beim Hamster kann man folglich die Knochenentwicklung postnatal schon von einem sehr frühen Entwicklungszeitpunkt an verfolgen.

1.2. Desmale Ossifikation

Durch desmale Ossifikation entstehen die meisten Knochen des Schädeldaches, viele Knochen in der Umgebung der Sinnesorgane und im Bereich des Gesichtsschädels und zum Teil die Schlüsselbeine und der Unterkiefer (GARDNER 1971).

Die desmale Ossifikation geht so vor sich, daß sich die Mesenchymzellen an bestimmten Stellen, Ossifikationsstellen, reichlich vermehren und zu Osteoblasten differenzieren.(BUCHER 1973). Die Osteoblasten scheiden die mukopolysaccharidhaltige Grundsubstanz, das Osteoid, aus. Im Osteoid polymerisiert das ebenfalls von den Osteoblasten ausgeschiedene Tropokollagen zu Kollagenfibrillen (LEONHARDT 1971). Abschließend wird Calciumphosphat in die Knochenmatrix in Form von Hydroxylapatitkristallen eingelagert. Diese Vorgänge, das heißt die Polymerisation zu Fibrillen und die Verkalkung der Knochenmatrix, laufen gleichzeitig ab, zumindest bei Ratten (GARDNER 1972).

Ein so entstandenes kleines Knochenbälkchen ist umgeben von Osteoblasten. Bei weiterem appositionellen Wachstum werden einige Osteoblasten in die Matrix eingeschlossen und werden so zu Osteozyten. Die einzelnen Bälkchen wachsen nun radiär vom Ossifikationspunkt aus: Sie werden untereinander durch sekundäre Bälkchen verbunden. Die zwischen den Bälkchen liegenden Räume werden von vaskularisiertem Bindegewebe ausgefüllt, dem Vorläufer des hämatopoetischen Knochenmarkes (GARDNER 1972).

Dieses Prinzip der desmalen Ossifikation kann bei allen Bindegewebsknochen festgestellt werden, nur die Art des Wachstums und die Ausrichtung der Bälkchen sind in den einzelnen Knochen unterschiedlich (GARDNER 1972).

Eine besondere Art von Knorpel, der Sekundärknorpel, ist mit bestimmten Bindegewebsknochen verbunden. Im einzelnen tritt dieser Knorpel beim Unterkiefer und beim

Schlüsselbein auf. Er wird erst nach dem Beginn der desmalen Ossifikation ausgebildet und ist durch große Zellen mit wenig Interzellularsubstanz charakterisiert. Er ist kein Knorpelmodell des späteren Knochen, jedoch ist er am Wachstumsprozeß des Knochens beteiligt genau wie der Knorpel anderer Knochen, die chondral verknöchern (GARDNER 1972).

1.3 Die Entwicklung einzelner desmal entstehender Knochen

1.3.1 Knochen des Schädeldaches

Die Ausbildung der Schädelknochen hat genetische Ursachen, jedoch scheinen mechanische Faktoren ihren späteren Entwicklungsgang zu beeinflussen. Die Knochen passen sich dem Wachstum des Gehirns primär durch eine Änderung der Krümmung an. Dies geschieht hauptsächlich dadurch, daß Knochensubstanz an der äußeren Oberfläche angelagert wird zu den Rändern der einzelnen Schädeldachknochen hin in ständig größer werdendem Ausmaß, mit Resorption von Knochen an der inneren Oberfläche. Die Resorption ist entsprechend der Knochenanlagerung an den Rändern der Schädelknochen verstärkt. Aus diesen Prozessen ergibt sich die Abnahme der Krümmung der einzelnen Schädelknochen. Die Resorption geschieht insgesamt zu einem geringeren Grad, da der Knochen an Stärke zunimmt (GARDNER 1972).

1.3.1.1 Die Parietalknochen

Ausgehend von einem Zentrum oder einem Paar von Zentren, die sich in der frühen Fetalperiode bilden, entwickelt sich das Os parietale. Die Zentren vereinigen sich zu einer Zentralplatte, von der aus die Trabekel radiär wachsen. Der Parietalknochen wächst schnell, bis er seine endgültige Form erreicht hat. Danach wächst er langsamer, entsprechend dem Wachstum des gesamten Schädels (GARDNER 1972). Nach der Geburt ist die mengenmäßig große, ektocranielle Knochenapposition an der medialen Kante des Os parietale auffällig. Desgleichen findet man an der lateralen Kante eine ektocranielle Apposition. Endocraniell wird Knochensubstanz in der Mitte des Knochens angelagert. Aus dieser Verteilung der Knochenanlagerung ergibt sich eine Abflachung des Parietalknochen, die noch durch entsprechende

Resorptionsvorgänge unterstützt wird (YOUNG 1962). Völlig analog laufen die Vorgänge auch bei allen anderen Knochen des Schädeldaches ab (STARK 1975).

1.3.1.2 Die Frontalknochen

Zuerst wird Knochen in der Gegend des Augenbrauenbogens gebildet, wo die Ossifikation der Frontalknochen in der späten Embryonal- oder der frühen Fetalperiode beginnt. Initial findet man ein schnelles Wachstum des Knochens, bis er das definitive Gebiet abdeckt. Von dem Zeitpunkt an hält das Wachstum schritt mit dem Rest des Schädels (IMMAN und NOBACK zitiert nach GARDNER 1972).

1.3.2 Der Gesichtsschädel

Die den Gesichtsschädel bildenden Knochen sind zum größten Teil Deckknochen. Dazu gehören das Os frontale, die Maxilla, das Os palatinum, das Os nasale, lacrimale und zygomaticum, der Vomer und eingeschränkt auch die Mandibula, deren Entwicklung jedoch noch gesondert erwähnt wird. Ersatzknochen findet man im Bereich des Gesichtsschädels im Rahmen der Ossifikation der knorpeligen Nasenkapsel, wobei die wesentliche chondrale Ossifikation das Siebbein (Ethmoid) ist. Auch das Os conchae (Concha inferior) entsteht durch chondrale Ossifikation (STARK 1975). Aus dem gesagten geht hervor, daß alle Knochen, die den Rand des Einganges der Augenhöhle bilden, desmalen Ursprungs sind.

1.3.3 Der Unterkiefer

Der Unterkiefer erscheint sehr früh als erster Schädelknochen (STARK 1975). Die Ossifikation beginnt an der Außenseite des ventralen Anteils des Meckelschen Knorpels in der

Gegend des zukünftigen Körpers der Mandibula. Gegen Ende der Embryonalperiode ist die Kondensation des endgültigen Unterkiefers genau bestimmt, und die Ossifikation schreitet entsprechend fort. Der obere laterale Teil des Meckelschen Knorpels wird mit periostalen Knochen überzogen. Dem folgt ein Einsprossen von Gefäßen und danach die enchondrale Ossifikation. Es ist nur diese Region des Meckelschen Knorpels, von der gesagt werden kann, daß sie enchondraler Ossifikation unterliegt. Der Rest des Knorpels verschwindet normalerweise (GARDNER 1972). Im Rahmen der Entwicklung kommt Sekundärknorpel im Proc. condylaris, im Angulusgebiet, im Proc. coronoideus und vielleicht auch in der Symphysengegend vor (STARK 1975, LOW 1909). Bald nach dem ersten Auftreten von Sekundärknorpel verkalkt dieser und wird vaskularisiert. Die enchondrale Ossifikation beginnt etwas später (GARDNER 1972). Das Wachstum des Unterkiefers geschieht folgendermaßen: Durch Knochenanlagerung an die lateralen Oberflächen wächst die Mandibula in die Breite, durch Anlagerung an die Vorderfläche der Symphyse nach vorn und durch Anlagerung an die rückwärtige Grenze vom Proc. condylaris bis zum Angulus nach hinten. Anteriore Absorption und posteriore Anlagerung an den Zahnsockeln erlaubt den Zähnen, nach vorn zu wachsen und Platz für Molaren zu machen(GARDNER 1972).

Auch der Unterkiefer des Hamsters verknöchert als erster Knochen des Hamsterschädels, ausgehend von einem lateral des Meckelschen Knorpels liegenden Ossifikationszentrum (BEATTY 1950). Bis auf Unterschiede im Gebiß - das Fehlen der Eckzähne und das Vorhandensein von drei Praemolaren und drei Molaren - kann man von einer entsprechenden Entwicklung wie beim Menschen ausgehen.

1.4 Autoradiographie mit ^{3}H - Aminosäuren und Allgemeines

Zusätzlich zu morphologischen Beobachtungen ermöglicht die Autoradiographie weitergehende Aussagen über Funktion und Stoffwechsel der Zellen innerhalb eines Gewebes.

Autoradiographische Untersuchungen mit einer tritiummarkierten Aminosäure indizieren in Knorpel und Knochen nicht nur den jeweiligen Umsatz dieser einen Aminosäure, sondern sie zeigen den Gesamteiweißstoffwechsel der Zellen an (KOBURG 1961). Die fettfreie entkalkte Matrixsubstanz des Knochens besteht zum großen Teil aus Kollagen (TONNA, CRONKITE und PAVELEC 1963). Für den Knochen konnte TONNA (1964) nachweisen, daß der weitaus gräßte Teil der Silberkörner, die sich nach Applikation von ^{3}H - Glycin über den Knochen darstellen, auf markiertem Kollagen beruhen, und daß die Strahlung, die beim Knochen auf markierten Mucopolysacchariden beruht, vernachläßigt werden kann. Beim Knorpelgewebe liegt der Anteil der Silberkörner höher, die auf Strahlung von Aminosäuren aus Eiweißstrukturen des Mucopolysaccharides zurückzuführen sind. Er wird von TONNA (1964) bei appliziertem Glycin mit 5% angegeben.

Durch diese Ausführungen wird deutlich, daß autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H - Glycin Auskunft über den Kollagenstoffwechsel von Knochen- und Knorpelzellen liefern können. Kollagen wird nach RAPPOPORT (1973) folgendermaßen synthetisiert: Die Fibroblasten beziehungsweise auch Osteo- und Chondroblasten produzieren intrazellulär eine lösliche Vorstufe, das Tropokollagen. Diese Vorstufe wird in die Extracellelarsubstanz ausgeschieden und polymerisiert dort zum unlöslichen Kollagen.

Das zelluläre Stadium der applizierten ^{3}H - Aminosäure wurde ausführlich von MORRIS, FESSLER L.J., WEINSTOCK und FESSLER J.H. (1975) untersucht. Bei ^{3}H - Prolinapplikation an Hühnchenembryos fanden sie nach fünf Minuten Markierungen über dem basophilen Cytoplasma (rauhes ER) der Osteoblasten. Nach 20 Minuten lagen die Silberkörner

in Haufen über den paranucleären Regionen der Osteoblasten. 35 Minuten nach der Applikation war das periphere Cytoplasma der Osteoblasten markiert und bereits nach 120 Minuten war ein breiter Streifen markierter Matrix zu sehen. Extracellulär stellt sich das markierte Kollagen beziehungsweise seine Bausteine in der Knochenmatrix meist in Form von Bändern aus Silberkörnern längs von Osteoblastenreihen dar (LEBLOND, WEINSTOCK 1972; TONNA, CRONKITE, PAVELEC 1962; TONNA und PAVELEC 1971).

^{3}H - Aminosäuren ermöglichen mit ihrer mittleren Reichweite der Betastrahlung von 1 μ in H_2O ein hohes Auflösungsvermögen und damit eine genaue Zuordnung der Strahlungsquelle zum entsprechenden Gewebe im histologischen Bild.

1.5 Autoradiographieergebnisse nach Applikation von ^{35}S - Sulfat

Sowohl beim Knochen wie beim Knorpel werden nach Applikation von ^{35}S als Na_2SO_4 zuerst die entsprechenden Zellen und dann die dazugehörige Interzellularsubstanz markiert (DZIEWIATKOWSKIE D.D. 1949, 1962; AMPRINO 1955). Beim Knorpel wird der markierte Schwefel zum größten Teil in das Chondroitinsulfat eingebaut, und zwar zu 89% (DZIEWIATKOWSKIE 1962). Auch beim Knochen findet man den größten Teil des ^{35}S in der organischen Matrix des Knochengewebes (AMPRINO 1955). Die Markierung des Knorpels wird als eine diffuse, gleichmäßige beschrieben (AMPRINO 1955). Der Knochen wird in einer der ^{3}H - Aminosäureapplikation entsprechenden Art und Weise markiert. Auch hier wird das Isotop zuerst nur von den Osteoblasten aufgenommen. Die Matrix wird nur dann markiert, wenn diese von den anliegenden Osteoblasten nach der Isotopapplikation produziert wird (AMPRINO 1955). Die größte Aktivität in bezug auf die ^{35}S - Aufnahmen fanden übereinstimmend AMPRINO und DZIEWIATKOWSKIE über den hypertrophen Knorpelzellen im Rahmen der enchondralen Ossifikation.

AMPRINO untersuchte auch die ^{35}S - Einlagerung in embryonales praecartilaginaeres und praeosseäres Mesenchym zu frühen Entwicklungszeitpunkten, das heißt, bevor diese Gewebe ihr spezifisch strukturiertes, histologisches Aussehen annahmen. Zu diesem Zeitpunkt sind die mesenchymalen Blasteme zellreich und die Interzellularsubstanz ist selten. Bei diesen Geweben fand AMPRINO eine hohe ^{35}S - Einlagerung in den Zellen. Er deutete die ^{35}S - Aufnahme als ersten Schritt der Chondroitinsulfatsynthese. Daraus schlußfolgerte er, daß in den embryologisch determinierten Zellen die biochemische Differenzierung vor der morphologischen Differenzierung abläuft.

2 Problemstellung

Mit Hilfe dieser Arbeit wollten wir Erkenntnisse über die desmale Knochenentwicklung gewinnen; wir wählten die Methode der Autoradiographie nach ^{3}H - Glycin-Applikation. Die desmale Ossifikation soll nicht nur an einem Knochen untersucht werden, sondern die Knochenentwicklung verschiedener Knochen beobachtet werden, um vergleichend umfassende Aussagen über die desmale Ossifikation machen zu können. Da sich am Schädel nahezu alle Knochen desmal entwickeln, ausgenommen die Schädelbasis und ein Teil der Nase, schien er uns das geeignete Untersuchungsobjekt.

Besonders wird in dieser Arbeit das autoradiographische Verhalten der knochenbildenden Zellen - Osteoblasten, Osteocyten - und jener Bindegewebszellen beobachtet, denen eine osteoblastische Potenz in der Literatur nachgesagt wird, weil wir uns aus der Untersuchung dieser Zellen Aufschlüsse über die initialen Vorgänge der desmalen Knochenentwicklung erhoffen. Dazu gehören die Periostzellen und die mehr oder weniger differenzierten Bindegewebszellen in der Umgebung der desmalen Knochenentwicklung. An diesen Zellen wird speziell untersucht, ob sich gegebenenfalls im Stoffwechsel des Kollagenbausteins Glycin eine Veränderung - Vermehrung - bemerkbar macht, bevor die Zellen sich auch morphologisch erkennbar zu Osteoblasten wandeln. Die Arbeit beschränkt sich dabei auf den postnatalen Anteil der desmalen Knochenentwicklung.

Am Rande wird nicht nur das Wachstum der einzelnen Knochenbälkchen untersucht, sondern wir beobachteten auch den Wachstumsprozeß des gesamten untersuchten Knochen des Hamsterschädels. Hierbei wollen wir sehen, ob sich unsere Beobachtungen mit denen von YOUNG (1962), GARDNER (1972) und TONNA (1975) decken, die bereits Wachstumsvorgänge von einzelnen Schädelstrukturen auf Grund von autoradiographischen Untersuchungen beschrieben haben.

Vergleichend zur desmalen Ossifikation wird im Rahmen dieser Arbeit auch die Verknöcherung einer Knorpelstruktur untersucht. Dabei handelt es sich um den am Unterkiefer vorkommenden Sekundärknorpel. Dieser Knorpel stellt eine besondere Form von Knorpelgewebe dar. Angaben über eine autoradiographische Untersuchung seiner Verknöcherung haben wir in der uns zugänglichen Literatur nicht gefunden. Speziell soll auch an diesem Gewebe wieder das Verhalten beziehungsweise die Verteilung der autoradiographischen Markierung der zellulären Strukturen beobachtet werden. Dazu zählen die proliverativen, die normalen und die hypertrophen Chondroblasten; ferner die Bindegewebszellen des Perichondriums, der Umbauzone und des Periostes und natürlich die Osteoblasten und -cyten aus der Ossifikationszone. Die Ergebnisse, die sich aus der Untersuchung dieser Verknöcherungszone ergeben, sollen mit denen, die wir in der Literatur über die enchondrale Ossifikation langer Röhrenknochen fanden, verglichen werden.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E

3 Material und Methode

Je zwei Hamstern im Alter von einem Tag, fünf Tagen, neun Tagen, dreizehn Tagen und siebzehn Tagen wurde intraperitoneal 10 μ ci ^{3}H - Glycin pro Gramm Körpergewicht appliziert. Von den beiden Hamstern einer Altersgruppe wurde der eine eine Stunde und der andere drei Stunden nach der Applikation getötet. Zur histologischen Verarbeitung wurden die Köpfe der Hamster in Titriplex entkalkt und anschließend in Paraffin eingebettet. Wir fertigten sodann 5 μ dicke Serienschnitte der Köpfe an, von denen wir jeden fünften Schnitt Hämatoxilin-Eosin färbten. An Hand dieser Schnitte wurden 200 Präparate ausgesucht, von jedem Hamster 20. Diese entparaffinierten Schnitte wurden mit der Ilford Emulsion K 5 in Gelform Z 7397 autoradiographisch behandelt und acht bis zehn Wochen bei $4^{o}C$ exponiert. Entwickelt wurden die Präparate mit Ilford Phenisol und danach im Agfa Röntgenschnellfixierbad G 334 fixiert. Anschließend färbten wir die autoradiographisch vorbehandelten Präparate mit Hamatoxilin-Eosin. So können die autoradiographischen Befunde einzelnen histologischen Geweben zugeordnet werden.

Bei jedem der Hamster untersuchten wir an 20 Präparaten drei verschiedene Regionen desmaler Ossifikation im Bereich des Hamsterschädels. Zusätzlich wurde die Verknöcherung des im Unterkiefer auftretenden sekundären Knorpels untersucht.

Untersuchte Regionen:

1. ein Teil des vorderen Schädeldaches (Os frontale et parietale),
2. ein lateraler Teil des knöchernen Orbitarandes,
3. die knöcherne Struktur einer Schneidezahnalveole des Unterkiefers,
4. die Verknöcherungszone des im Unterkiefer auftretenden sekundären Knorpels.

Zur Kontrolle der histologischen Differenzierung der einzelnen Gewebe in den untersuchten Regionen wurden zusätzlich 40 Präparate nach Schaffer und 30 PAS gefärbt.

E I G E N E B E O B A C H T U N G E N

4.1 Markierung der Zellen und Osteoidproduktion

Im folgenden Abschnitt beschreiben wir das Markierungsverhalten ausgesuchter, im nachstehenden aufgeführter Zellen und deren Osteoidproduktion. Wir stellen diesen Abschnitt vor die histologische und autoradiographische Beobachtung der einzelnen untersuchten Regionen, da die folgenden Beobachtungen in allen Regionen übereinstimmen. Insbesondere wird das Markierungsverhalten der typischen Knochenzellen wie Osteoblast, Osteocyt und Osteoklast sowie das Markierungsverhalten der Zellen des Periostes und das des einem Knochenbälkchen anliegenden Bindegewebes beschrieben.

Im Ein-Stunden-Bild waren die an Knochenbälkchen gelegenen Osteoblasten zumeist deutlich markiert, jedoch nicht alle Osteoblasten zeigten eine Markierung. Besonders bei den älteren Tieren (dreizehn und siebzehn Tage) mit den zumeist schon etwas dickeren Bälkchen konnte man im Hinblick auf die Knochenproduktion aktive von mehr passiven Regionen unterscheiden. Auch markiert war im Ein-Stunden-Bild ein ganz schmaler Streifen von sezerniertem Osteoid, das an das Knochenbälkchen angelagert war. Die Fibrozyten des sich anschließenden Periostes beziehungsweise die Zellen des Bindegewebes, in das das Bälkchen eingelagert war, zeigten nie eine Markierung, abgesehen vom Nulleffekt. Es konnte stets nur dann eine Markierung von Zellen beobachtet werden, wenn diese bereits Osteoid produziert und sezerniert hatten.

Im Drei-Stunden-Bild war die Markierung der Osteoblasten geringer. Ein breiter Streifen von neu produziertem Osteoid war längs der Knochenbälkchen markiert. Die Breite des markierten Streifens entsprach der in drei Stunden von den Osteoblasten produzierten Knochengrundsubstanz. Bereits bestehende Knochensubstanz zeigte keinerlei Markierung.

Innerhalb der Knochensubstanz waren häufiger Osteocyten sowohl im Ein-Stunden-Bild wie auch im Drei-Stunden-Bild

markiert. Die Markierung der Osteocyten war immer dann stärker, wenn die Knochenhöhle, in der der Osteocyt lag, noch größer war als der Osteocyt selbst. Je mehr der Osteocyt ein kleineres, mehr längliches Aussehen annahm mit geringer werdender Basophilie des Cytoplasmas, desto geringer wurde auch seine Markierung und desto "enger" war seine Knochenhöhle. In der Umgebung der mehr osteoblastisch aussehenden Osteocyten in größeren Höhlen konnten wir wieder markiertes Osteoid sowohl im Ein-Stunden-Bild wie auch im Drei-Stunden-Bild sehen, welches an den Wänden der Knochenhöhle angelagert war.

Osteoklasten waren in keinem Präparat markiert. Das Verhalten der Knorpelzellen und Knorpelgrundsubstanz im Hinblick auf eine Markierung wird zusammen mit dem Verhalten des Sekundärknorpels des Unterkiefers und seiner Ossifikation beschrieben.

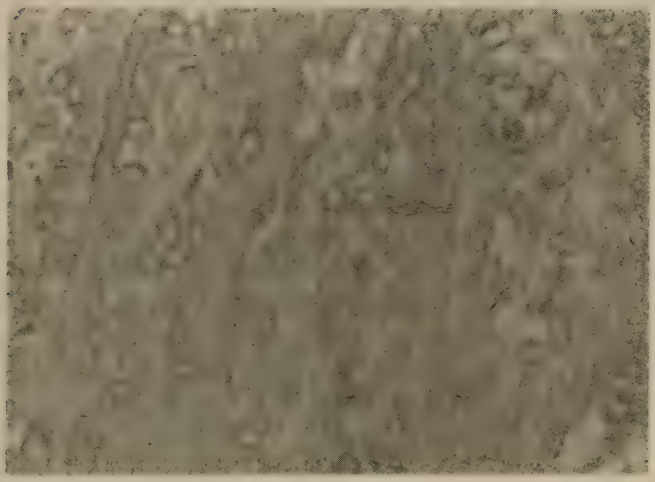

Abb. 1 Markierte Knochenbälkchen aus dem Orbitarand. Dreizehn Tage alter Hamster. Tötung eine Stunde nach Nuklidapplikation.
H.E. Färbung.
Vergrößerung 400 x.

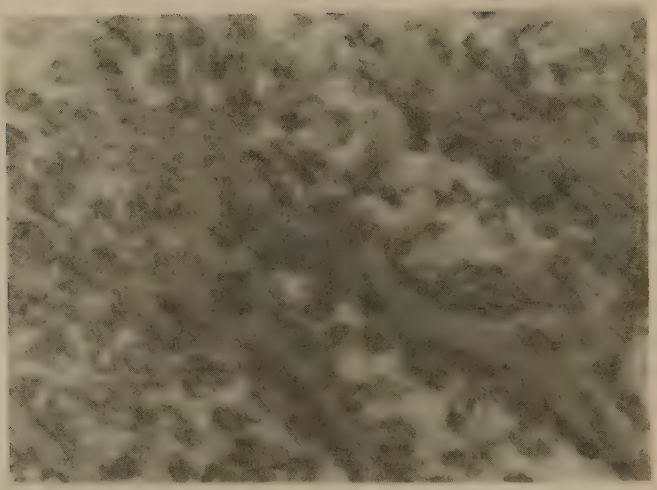

Abb. 2 Markierte Osteocyten und markiertes Osteoid in Osteocytenhöhle.
Fünf Tage alter Hamster. Tötung drei Stunden nach Nuklidapplikation.
H.E. Färbung.
Vergrößerung 400 x.

4.2 Beobachtungen aus den einzelnen untersuchten Regionen

Im folgenden werden die Beobachtungen aus den einzelnen untersuchten Regionen wiedergegeben, und zwar derart, daß zuerst die Histologie der Gewebe und danach die Darstellung und Verteilung der Markierung in der entsprechenden Region des Hamsterschädels beschrieben werden.

4.2.1 Bereich des sich entwickelnden Schädeldaches

4.2.1.1 Histologische Befunde

Zwischen dem Periost, welches den Knochen gegen das Bindegewebe der Kopfhaut abdeckt und der Dura mater auf der Innenseite fanden wir eine Reihe von Knochenbälkchen, deren Dicke mit dem Alter der Hamster zunimmt. An die Knochenbälkchen waren nach allen Seiten hin Osteoblasten angelagert. Bei den einen Tag alten Hamstern waren die Knochenbälkchen noch sehr fein, bei den drei Tage alten fanden wir bereits in die Knochensubstanz eingelagerte Osteocyten. Von diesem Zeitpunkt an waren auch Osteoklasten in den Präparaten zu sehen. Mit zunehmendem Alter der Hamster traten dann auch Hohlräume in den dickeren Knochenstrukturen auf. Die innere Oberfläche dieser Hohlräume war ebenfalls mit Osteoblasten ausgekleidet. Außerdem fanden wir gefäßreiches Bindegewebe und zum Teil Osteoklasten in den Hohlräumen. Insgesamt waren die meisten Osteoklasten an der endocraniellen Oberfläche des Knochens zu sehen.

4.2.1.2 Verteilung der Markierung

Bei den jungen Hamstern mit feinen Knochenbälkchen waren stets alle Osteoblasten und das anliegende Osteoid in typischer Weise markiert, so daß sich Bänder markierter Substanz längs der Knochenbälkchen ergaben. Bei fünf

Tage alten und älteren Hamstern verteilte sich die Markierung über der Schädelkalotte folgendermaßen: Die ektokranielle Oberfläche war stärker markiert als die endokranielle, an der zum großen Teil fast gar keine Markierung mehr zu finden war. Wenn endokraniell Markierung zu sehen war, lag diese in etwa im Bereich des Zentrums des Os parietale. Ektokraniell konnten wir verstärkt Markierungen in den mehr occipital, frontal und lateral gelegenen Bereichen der Schädelkalotte beobachten.

4.2.2 Lateraler Teil des knöchernen Orbitarandes

4.2.2.1 Histologische Befunde

Auch hier fanden wir typische Knochenbälkchen, die von Osteoblasten gesäumt werden. Die Bälkchen selbst lagen in einem fibrocytenreichen Bindegewebsverband. Mit zunehmendem Alter der Hamster nahmen die Bälkchen an Dicke zu, und wir konnten dann auch in die Knochenbälkchen eingeschlossene Osteocyten sehen.

4.2.2.2 Verteilung der Markierung

Im Ein-Stunden-Bild lag die Markierung hauptsächlich über den längs eines Knochenbälkchen sich aufreihenden Osteoblasten. Zum Teil war schon jetzt zwischen dem Bälkchen und den Osteoblasten liegendes frisches Osteoid markiert. Die Markierung der Osteoblasten war im Drei-Stunden-Bild schwächer, jedoch sahen wir jetzt die typische bänderförmige Markierung frischen Osteoids längs der Knochenbälkchen. Keine Markierung zeigten die in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Osteoblasten liegenden Fibrocyten.

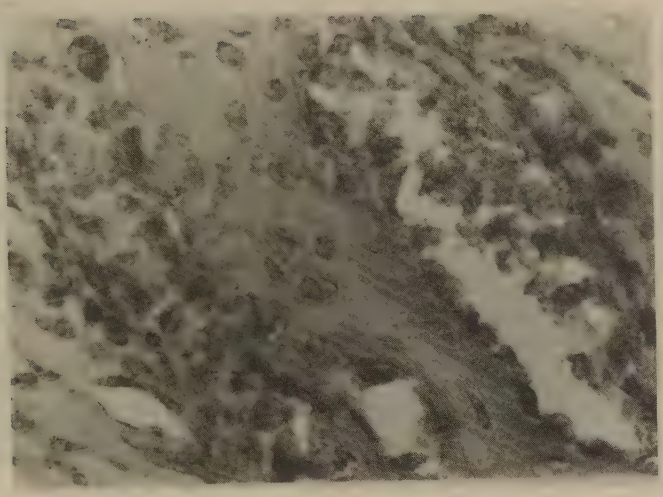

Abb. 3 Markierte Knochengrundsubstanz und markierte Osteoblasten.
Fünf Tage alter Hamster. Tötung drei Stunden nach Nuklidapplikation.
H.E. Färbung.
Vergrößerung 400 x.

4.2.3 Die knöcherne Struktur einer Schneidezahnalveole des Unterkiefers

4.2.3.1 Histologische Befunde

Wir sahen ganz typische Knochenbälkchen mit angelagerten Osteoblasten und bereits eingeschlossenen Osteocyten. Die sich aus den Bälkchen ergebende Knochenstruktur umgab den sich ausbildenden und wachsenden Zahn. Der Knochen der Zahnalveole ging in den des corpus mandibulae über. Osteoklasten waren vermehrt an der frontalen Innenfläche der Zahnalveole zu beobachten.

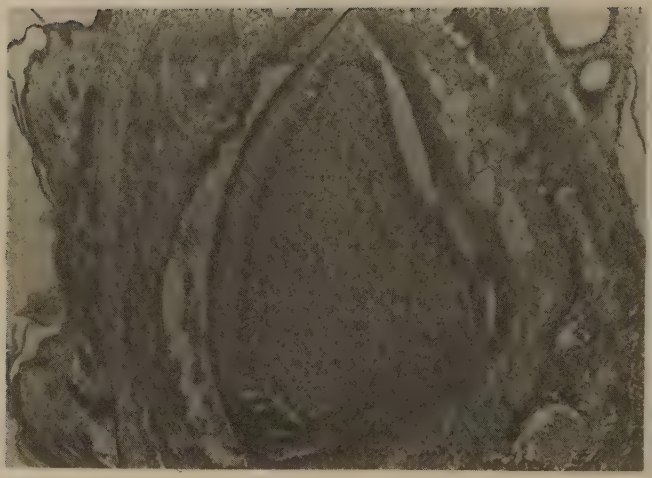

Abb. 4 Schneidezahn des Unterkiefers.
Fünf Tage alter Hamster. Tötung eine Stunde nach Nuklidapplikation.
H.E. Färbung.
Vergrößerung 40 x.

4.2.3.2 Verteilung der Markierung

Osteoblasten, -cyten und Osteoid waren, wie bereits beschrieben, markiert. Die Markierung verteilte sich auf die Zahnalveole folgendermaßen: a) dorsale Innenfläche der Alveole und b) Bodenfläche der Zahnalveole. Ferner konnte eine Markierung an der Vorderfläche des Unterkiefers beobachtet werden. Wenig oder keine Markierung war an der ventralen Innenfläche der Alveole zu sehen.

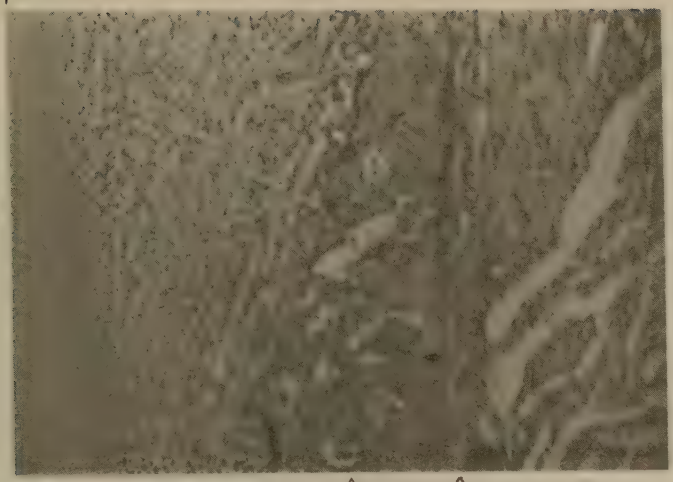

Abb. 5 Alveolarknochen von der Rückwand der Zahnalveole ist an der zum Zahn gelegenen Seite markiert. Neun Tage alter Hamster. Tötung drei Stunden nach Nuklidapplikation.
H.E. Färbung.
Vergrößerung 100 x.

4.2.4 Die Ossifikation des im Unterkiefer auftretenden Sekundärknorpels

4.2.4.1 Histologische Befunde

Wenn wir den Knorpel von der Seite, an der die Knochenbildung stattfindet, betrachten, konnten wir folgende willkürlich festgelegte Zonen unterscheiden, zwischen denen jeweils ein fließender Übergang bestand. In der ersten Zone wurde der Knorpel durch mehrkernige Chondroklasten abgebaut, und es wurden feinste Knochenbälkchen durch Osteoblasten aufgebaut. Auch sahen wir, daß Osteoblasten an verkalkte Knorpelgrundsubstanz Osteoid anlagerten und so neue Knochenbälkchen entstanden. Zwischen den Bälkchen fanden wir homogene Massen noch nicht abgebauter Knorpelgrundsubstanz. In Richtung des neugebildeten Knochens war primäres Knochenmark zwischen den Bälkchen zu sehen. Hinter der Umbauzone fanden wir die breiteste Zone, den eigentlichen Sekundärknorpel. Er bestand aus großblasigen Zellen und wenig Interzellularsubstanz. Die einzelnen Zellen stießen fast nahtlos aneinander und waren nicht zu Chondronen zusammengefaßt. Darauf folgte eine Zone mit kleineren Knorpelzellen. Wir sahen dort wieder keine Chondronenbildung. Darauf kam eine Schicht, in der keine Interzellularsubstanz mehr zu finden war. Diese außerordentliche zellreiche Schicht bestand aus kleinen Zellen, die fast ganz von ihrem Kern ausgefüllt wurden. Diese Zone ging ohne feste Grenze ins Perichondrium über, das aus länglich ausgezogenen, längs zur Knorpelzellenfläche liegenden Fibrocyten bestand.

Seitlich der Zone des großblasigen Knorpels sahen wir ganz feine Knochenbälkchen, die auf die großblasigen Zellen direkt aufgelagert waren. Diese Knochenbälkchen bildeten eine Knochenmanschette um den Sekundärknorpel. Zwischen Knochenbälkchen und Knorpelzellen konnten keine Chondroklasten gefunden werden. Der aufgelagerte Knochen war zum angrenzenden Gewebe hin durch ein Periost abgedeckt.

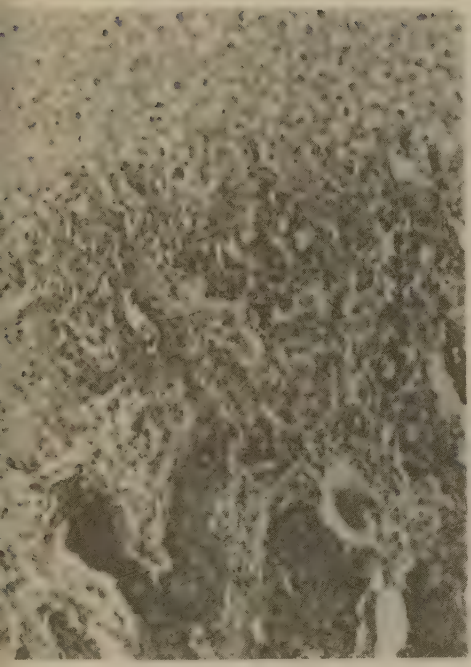

Abb. 6 Umbauzone des Sekundärknorpels.
Siebzehn Tage alter Hamster. Tötung eine Stunde nach Nuklidapplikation.
H.E. Färbung.
Vergrößerung 40 x.

Abb. 7 Periostale Knochenmanschette des Sekundärknorpels am Unterkiefer. Nur Markierung an der zum Periost gelegenen Seite des Knochens.
Neun Tage alter Hamster. Tötung drei Stunden nach Nuklidapplikation.
H.E. Färbung.
Vergrößerung 400 x.

4.2.4.2 Verteilung der Markierung

Die großblasigen Knorpelzellen waren bis auf den Nulleffekt in keinem Präparat markiert. Das gleiche galt für die Knorpelgrundsubstanz. Markiert fanden wir die Osteoblasten und das von diesen ausgeschiedene frische Osteoid. Die Osteoblasten waren nur dann markiert, wenn sie auch Osteoid sezerniert hatten. Besonders bei Tieren, die wir drei

Stunden nach der Nuklidapplikation töteten, konnten wir typische Bänder markierten Osteoids längs der Knochenbälkchen, aber auch längs von verkalkter Knorpelgrundsubstanz finden. Markierung trat nicht nur in der Umbauzone auf, sondern es waren auch die Osteoblasten und das von ihnen produzierte Osteoid markiert, die seitlich des großblasigen Knorpels unter dem Periost die Knochenmanschette bildeten (markierte Knochenmanschette siehe Abb. 7). An der Umschlagstelle, wo sich Perichondrium in Periost verwandelt, konnten wir keine Markierung der Bindegewebszellen sehen, es sei denn, sie hatten sich in Osteoblasten verwandelt und auch schon Osteoid produziert.

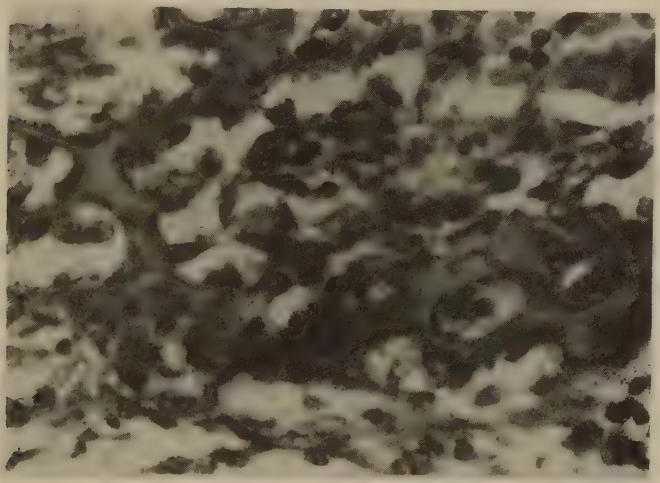

Abb. 8 Anlagerung von Osteoid an verkalkte Knorpelgrundsubstanz in der Umbauzone des Sekundärknorpels.
Siebzehn Tage alter Hamster. Tötung eine Stunde nach Nuklidapplikation.
H.E. Färbung.
Vergrößerung 400 x.

E R G E B N I S S E U N D D I S K U S S I O N

5.1 Ergebnisse, die sich aus der Markierung der Zellen und des Osteoids ableiten lassen

Die Osteoblasten verhalten sich im Hinblick auf die Markierung so, wie es die nachfolgend aufgeführten Autoren, die Osteoblasten nach der Applikation von markierten Aminosäuren beobachteten, beschrieben haben (CARNEIRO und LEBLOND 1959, CARNEIRO 1965, GREULICH und SLAVKIN 1965, HILDMANN 1975, KOBURG 1962, LEBLOND und WEINSTOCK 1972, MORRIS et al 1975, TONNA, CRONKITE und PAVELEC 1962 und 1963, TONNA 1965, TONNA und PAVELEC 1971, TONNA 1975, YOUNG 1962). Die Ergebnisse dieser Autoren können durch die Arbeit bestätigt werden. Die Osteoblasten waren sowohl eine wie auch drei Stunden nach der Applikation markiert. Osteoblasten waren im Ein-Stunden-Bild nur dann markiert, wenn sich in ihrer Umgebung auch markiertes Osteoid befand. Die Beobachtung deckt sich mit der Aussage von MORRIS et al (1975), wonach Knochenmatrix bereits 30 bis 35 Minuten nach der Applikation des Nuklides markiert war. Daß Osteoblasten zumal bei den älteren Tieren mit dickeren Knochenbälkchen nicht grundsätzlich markiert waren, kann man so erklären, daß diese Zellen im Augenblick kein Osteoid produzieren, denn Zellen nehmen nur bei Osteoidproduktion vermehrt Eiweißbausteine auf. Der Streifen markierter Knochengrundsubstanz, den wir im Drei-Stunden-Bild sahen, zeigt diejenige Menge Matrix an, die von den Osteoblasten in drei Stunden produziert wurde. Auch in diesem Bild waren die Osteoblasten markiert, jedoch schwächer als nach einer Stunde. Diese Beobachtung entspricht der von YOUNG (1967), nach der erst nach zwei Tagen eine Markierung der Osteoblasten völlig verschwand. Ferner beobachtete YOUNG, daß sich der markierte Streifen Knochenmatrix erst nach ungefähr 24 Stunden durch eine neue Schicht nicht oder sehr schwach markierter Knochengrundsubstanz gegen die Osteoblasten absetzte. Unsere Beobachtungen lassen sich in diesen Rahmen des zeitlichen Ablaufes der Matrixproduktion einreihen. Die Knochengrundsubstanz, ausgenommen die frisch produzierte, war niemals markiert. Nur die

Osteocyten darin zeigten zum Teil sowohl im Ein-Stunden- wie im Drei-Stunden-Bild Markierung. Genau wie bei den Osteoblasten waren die Osteocyten immer nur dann markiert, wenn sie auch noch Osteoid in die sie umgebende Knochenhöhle abgegeben hatten. Aus diesen Beobachtungen kann man schließen, daß die Umwandlung von Osteoblasten in Osteocyten folgendermaßen ablief: Einzelne Osteoblasten lösten sich aus dem an der Oberfläche der Knochenbälkchen gelegenen Osteoblastenverband und wurden in die Knochengrundsubstanz eingeschlossen. Diese Knochenhöhle kleideten die Osteocyten dann zunehmend mit Grundsubstanz aus, bis sie sich gänzlich eingemauert hatten. Während dieses Prozesses unterlagen sie dem morphologischen Wandel von Osteoblasten in Osteocyten.

Eine spezielle Markierung, abgesehen vom Nulleffekt (background), anderer Zellen in der Umgebung der Knochenbälkchen konnten wir bei der gewählten Expositionszeit nicht beobachten. So zeigten zum Beispiel die den Osteoblasten direkt benachbarten Fibrocyten des Periostes keine auffallende Markierung, obwohl sich aus diesen relativ undifferenzierten Zellen doch neue Osteoblasten rekrutieren sollen, die den Verlust an Osteoblasten ersetzen, der durch Umwandlung in Osteocyten entsteht. Insgesamt zeigten im Bereich des Hamsterschädels außer den knochenbildenden Zellen eine entsprechende auffallende Markierung:

a) Adamatoblasten,
b) Odontoblasten,
c) Drüsenzellen exokriner Drüsen,
d) Zellen im Auge des Hamsters.

An den Stellen der Knochenbildung waren jedoch stets nur Osteoblasten und -cyten markiert. Keine Zelle, der man knochenbildende Potenz nachsagt, wurde markiert. Erst die Zellen, die auch morphologisch als Osteoblasten zu erkennen waren, zeigten Markierung im autoradiographischen Präparat. Diese Beobachtung könnte man derjenigen AMPRINOS gegenüberstellen, in der er bei einer Untersuchung mit

^{35}S - Sulfat an embryonalem Gewebe feststellte, daß diejenigen der morphologisch undifferenzierten Mesenchymzellen markiert wurden, die sich später zu knochenbildenden Zellen entwickelten. AMPRINO (1962) schlußfolgerte aus seiner Beobachtung, daß die biochemische Differenzierung einer embryologisch determinierten Zelle vor der morphologischen Differenzierung abläuft. Diese Schlußfolgerung kann für die Verstoffwechselung von zur Kollagenproduktion benötigter Aminosäuren nicht bestätigt werden. Aus dieser Untersuchung ergibt sich vielmehr, daß die Zellen die markierte Aminosäure erst dann in verstärktem Maße aufnahmen, wenn sie sich auch bereits morphologisch zu Osteoblasten differenziert hatten und Osteoid produzierten.

5.2 Schädeldach

Die von GARDNER (1972) und YOUNG (1962) gemachten Aussagen über das Schädelwachstum können unterstützt werden. Erstens soll der Schädelinnenraum durch endokranielle Resorption und ektokranielle Apposition vergrößert werden, zweitens passe sich der Schädel dem Wachstum des Gehirns durch Abflachung vor allem der Ossa frontalia et parietalia an. Die erste Aussage wird schon gestützt durch die rein histologische Beobachtung, daß sich die weitaus meisten Osteoklasten an der inneren Oberfläche befanden. Eine Bestätigung für die Aussage findet man in der Verteilung der Markierung. Bei fünf Tage alten und älteren Hamstern fanden wir fast ausschließlich ektokraniell gelegene Osteoblasten und Osteoid markiert. Dies weist darauf hin, daß dort Knochenmaterial angelagert wurde. Die endokranielle Produktion von Knochenmatrix bei den ganz jungen Hamstern kann man wie folgt erklären: An die zuerst entstehenden feinen Knochenbälkchen wird anfangs sowohl endo- wie ektokraniell Knochenmatrix angelagert. Nachdem der Knochen eine gewisse Stärke und Größe erreicht hat, paßt er sich dem Wachstum des Gehirns durch primär ektokranielle Apposition an. Die Abflachung des Os parietale im Rahmen dieses Wachstumsprozesses wurde eingehend von YOUNG (1962) untersucht. Er fand eine mengenmäßig große ektokranielle Ablagerung am medialen und lateralen Rand des Os parietale. Im Zentrum sah er eine endokranielle Knochenanlagerung. Unterstützt durch entsprechende Resorptionsvorgänge ergab sich eine Abflachung der Parietalknochen.

In der eigenen Beobachtung verteilte sich die ektokranielle Apposition auf die mehr occipital, frontal und lateral gelegenen Bereiche der Schädelkalotte. Endokranielle Apposition fanden wir im Bereich des Zentrums des Os parietale. Dieses Verteilungsmuster entspricht den Untersuchungen YOUNGS und läßt sich in der gleichen Weise, nämlich als Abflachung der Schädeldachknochen im Rahmen ihres postnatalen Wachstums deuten.

5.3 Lateraler Teil des knöchernen Orbitarandes

An dieser desmal entstehenden Knochenstruktur wurde vornehmlich das Markierungsverhalten der einzelnen zellulären Strukturen beobachtet. Das heißt, daß die Ergebnisse bereits im Kapitel 5.1 zusammengefaßt und diskutiert sind. Ein besonderes Verhalten dieser Knochenstruktur im autoradiographischen Bild wurde nicht beobachtet.

5.4 Die knöcherne Struktur einer Schneidezahnalveole des Unterkiefers

Die gemachte Beobachtung, daß sich die Markierung auf die dorsale Innenfläche und die Bodenfläche der Zahnalveole verteilt, kann man als Bekräftigung der Aussage GARDNERS (1972) ansehen, daß die Zahnsockel angeblich nach vorne wachsen, um Molaren Platz zu machen. Die Markierung der Bodenfläche der Alveole läßt sich wie folgt erklären: Der Durchbruch eines Zahnes aus dem Unterkiefer in die Mundhöhle ist nicht allein ein Wachstumsvorgang des Zahnes, sondern die Zahnalveole mit dem Zahn als ganzes bewegt sich aus einer tieferen Ebene des Corpus mandibulae an die obere Kante des Unterkieferkörpers. Zusammengenommen ergibt sich daraus für den Schneidezahn beziehungsweise seine Alveole eine Bewegungs- oder auch Wachstumsrichtung nach vorn und oben. Die Beobachtung, daß an der ventralen Innenfläche der Alveole keine Markierung, dafür aber häufig Osteoklasten zu finden waren, unterstützt die gemachte Aussage. Daß die Vorderfläche des Unterkiefers markiert war, läßt sich mit einem Unterkieferwachstum nach vorn erklären. Dies deckt sich mit GARDNERS (1972) Aussage über das Wachstum des Unterkiefers.

Zweifel an der desmalen Genese der Unterkieferschneidezahnalveole könnte man auf Grund der Aussage LOWS (1909) bekommen. Er beschreibt, daß der Teil des Meckelschen Knorpels verknöchert und dem Teil des Unterkiefers einverleibt wird, der unterhalb und an der Innenseite des medialen und lateralen Schneidezahns liegt. Jedoch schon bei einer Scheitel-Steiß-Länge des Foetus von 80 mm ist der beschriebene Teil des Meckel-Knorpels vollkommen in das desmale Knochengewebe des Unterkiefers aufgegangen (LOW 1909). In der Literatur konnten wir zwar keine Angaben über das Verschwinden beziehungsweise die Verknöcherung des Meckelschen Knorpels beim Hamster finden, jedoch können wir auf Grund unserer Untersuchung sagen, daß die Veränderungen der Schneidezahnalveole des Hamsters nach der Geburt desmalen Ursprungs sind, da keine chondrale

Ossifikation mehr im Bereich der Schneidezahnalveole beobachtet und entsprechend von uns auch kein Knorpel in der beschriebenen Region gesehen wurde. Diese unsere Untersuchungen decken sich also mit den von LOW für den menschlichen Embryo gemachten Aussagen.

5.5 Die Ossifikation des im Unterkiefer auftretenden Sekundärknorpels

Nach der Arbeit von TONNA (1963), in der er die Verteilung der Markierung nach ^{3}H - Glycin - Applikation über der Epiphysenfuge des wachsenden Mäusefemur beschrieb, stellte sich die enchondrale Ossifikation langer Röhrenknochen folgendermaßen dar: 30 Minuten nach Nuklidapplikation waren die Knorpelzellen der proliferativen und der hypertrophen Zone des Epiphysenplattenknorpels stark markiert ebenso die diese Zellen umgebende Knorpelmatrix. Die Markierung der Knorpelmatrix erfolgte diffus und niemals in Form scharfer Bänder. Die Grundsubstanz der Proliferations- und hypertrophen Zone war im Vier-Stunden- und im Acht-Stunden-Bild verstärkt markiert. Nach sechszehn Stunden beziehungsweise nach einem Tag war die Matrix der degenerativen Zone markiert, während die Markierung im Bereich der proliferativen und der hypertrophen Zone abnahm. Zwei bis vier Tage nach der ^{3}H - Aminosäure - Applikation fand er auch verkalkte Knorpelgrundsubstanz markiert, die innerhalb neuer Knochenbälkchen lag. Eine entsprechende Verteilung der Markierung über den Strukturen einer Epiphyse fand AMPRINO (1955) nach Applikation von ^{35}S - Sulfat am Meerschweinchen. Die Proliferationszone war relativ stark markiert, das heißt, daß nicht nur eine Zellmultiplikation stattfand, sondern auch schon Interzellularsubstanz produziert wurde. Die Radioaktivität nahm zu über den hypertrophen Knorpelzellen, die in langen Reihen angeordnet waren. Die Markierung der Zellen ging deutlich zurück an der Stelle, an der die hypertrophen in die degenerierenden Knorpelzellen der Umbauzone übergingen.

Beiden Veröffentlichungen kann man entnehmen, daß sich die hypertrophen Knorpelzellen sowohl nach ^{3}H - Aminosäure- als auch nach ^{35}S - Sulfat - Applikation verstärkt darstellten und daraus schließen, daß diese Zellen einen großen Stoffwechsel hatten beziehungsweise in sehr starkem Maße an der Matrixproduktion beteiligt waren. Obwohl das histologische Bild der enchondralen Ossifikation

des Sekundärknorpels dem Bild entsprechender Verknöcherungsvorgänge an langen Röhrenknochen sehr ähnlich ist, zeigte doch die Verteilung der Markierung gerade über dem Knorpel Unterschiede.

Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten wir bei den gewählten Expositionszeiten keine Markierung des Knorpels feststellen. Weder die Chondroblasten, ob sie nun hypertrophiert waren oder nicht, noch die Knorpelgrundsubstanz zeigten eine über den Nulleffekt hinausgehende signifikante Markierung. Da bei dieser Form von Knorpel, der fast ausschließlich aus Zellen besteht, nur in sehr geringen Mengen Interzellularsubstanz vorkommt, ist das Ausbleiben einer signifikanten Markierung erklärlich.

Der weitaus größte Teil der sich in dieser Untersuchung darstellenden Markierung beruht auf Kollagen beziehungsweise seinen Vorstufen, die in den Zellen synthetisiert werden und außerhalb polimerisieren. Dieser Vorgang der Kollagenproduktion fand dementsprechend in den untersuchten Chondroblasten des sekundären Knorpel nur in sehr geringem Umfang statt. Die Hypertrophie der Zellen läßt sich also nicht mit einer verstärkten Knorpelmatrixproduktion erklären, zumindest für den Sekundärknorpel nicht. Die unterschiedliche Markierung von Epiphysenknorpel und Sekundärknorpel des Unterkiefers läßt sich gut verstehen, wenn man bedenkt, daß von der Epiphysenfuge das gesamte Längenwachstum des Röhrenknochens ausgeht, während man die fehlende Markierung des Sekundärknorpels so deuten kann, daß dieser Knorpel, einmal angelegt, nur Platzhalterfunktion ausübt. Er wächst nicht mehr selbst und wartet nur darauf zu verknöchern. Dies entspricht der Aussage GARDNERS (1972), der das Wachstum des Unterkiefers beschreibt als anteriore, laterale und posteriore Knochenablagerung, unterstützt durch entsprechende Abbauprozesse. Der Sekundärknorpel selbst spielt nach der Geburt, wie unsere Untersuchung belegt, keine Rolle im Rahmen des Wachstumsprozesses des Unterkiefers. Dies widerspricht - für die Zeit nach der Geburt - einer von GARDNER (1972)

gemachten Aussage über den Sekundärknorpel, in der er diesem eine Rolle im Wachstumsprozeß zusprach.

Markiert waren in dieser untersuchten Region nur die in der Umbauzone und perichondral gelegenen knochenbildenden Zellen und das von ihnen produzierte Osteoid. Auffallend daran ist, daß diese Strukturen das gleiche Markierungsverhalten wie Osteoblasten, -cyten und Osteoid des desmal entstehenden Knochens zeigten. Bei den perichondral gelegenen Knochenbälkchen war keine Umbauzone mit degenerierten Chondrocyten zu erkennen; ferner waren auch keine Chondroklasten zu beobachten und wurde Osteoid nicht an verkalkte Knorpelgrundsubstanz angelagert. Daraus ergibt sich, daß es sich bei dieser Knochenstruktur um desmal entstandenes, auf den Knorpel entsprechend der Knochenmanschette langer Röhrenknochen aufgelagertes Knochengewebe handelte. Aus der Übereinstimmung des Markierungsverhaltens der knochenbildenden Zellen der Umbauzone mit den knochenbildenden Zellen, die wir bei desmal entstehenden Knochen beobachteten, läßt sich auf ein zellulär gesehen gleiches Prinzip der Grundsubstanzproduktion schließen. Hierbei besteht nur der Unterschied, daß das Osteoid einmal an verkalkte Knorpelgrundsubstanz angelagert werden kann und zum anderen Mal die Knochenbälkchen rein aus dem Bindegewebe heraus entstehen.

Z U S A M M E N F A S S U N G

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde von uns die desmale Knochenentwicklung erstmalig mit Hilfe der ^{3}H - Aminosäure - Autoradiographie in einer umfassenden Untersuchung an Hamstern beschrieben. Hamster im Alter von einem Tag bis zu siebzehn Tagen wurden nach ^{3}H - Glycin-Applikation autoradiographisch behandelt. An folgenden Regionen untersuchten wir die desmale Ossifikation:

1. an einem Teil des Schädeldaches (Os frontale et parietale),
2. am lateralen Teil des knöchernen Orbitarandes,
3. an der knöchernen Struktur einer Schneidezahnalveole des Unterkiefers.

Zusätzlich wurde die Verknöcherungszone des im Unterkiefer auftretenden sekundären Knorpels untersucht.

Auf Grund der Literatur und dieser Arbeit können zusammenfassende Aussagen über die desmale Ossifikation gemacht werden.

1. Der aus der Literatur von der chondralen Ossifikation bekannte Ablauf der Matrixproduktion durch die Osteoblasten kann auch für die desmale Ossifikation bestätigt werden; er läuft dort in gleicher Weise ab.

2. Im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, daß die Osteocyten, auch wenn sie schon in ihrer Knochenhöhle lagen, noch osteoblastisch tätig waren. Das heißt, daß sie Osteoid produzierten und sich so, bildlich gesprochen, einmauerten.

3. Nicht markiert waren in dieser Untersuchung hingegen die Zellen des Periostes, die nicht Osteoblasten sind, sowie die Bindegewebszellen in der Umgebung der Knochenbälkchen, denen in der Literatur osteoblastische Potenz nachgesagt wird. Eine deutliche Markierung von Zellen nach ^{3}H - Glycin-Applikation war immer nur dann zu sehen, wenn die Zellen auch morphologisch als Osteoblasten zu erkennen waren. Das heißt, daß mit der

^{3}H - Aminosäure - Autoradiographie bei den von uns gewählten Zeiten keine biochemische Differenzierung von möglicherweise knochenbildenden Zellen vor deren morphologischer Differenzierung zu solchen nachweisbar war.

4. Beschrieben werden in dieser Arbeit auch die Wachstumsprozesse ganzer Knochenstrukturen aus den untersuchten Regionen. Hier können die Aussagen der Literatur sowohl für das Wachstum des Schädeldaches als auch für das der Zahnalveole bestätigt werden.

5. Die Ossifikationszone des im Unterkiefer auftretenden Sekundärknorpels wird der in der Literatur beschriebenen Verknöcherung der Epiphysenfuge langer Röhrenknochen gegenübergestellt. Dabei wird festgestellt, daß die Verknöcherung des Sekundärknorpels zwar morphologisch-histologisch der Verknöcherung des Epiphysenknorpels sehr ähnlich ist. Das autoradiographische Bild beweist jedoch, daß dem Sekundärknorpel keine der Epiphysenfuge entsprechende Funktion im Wachstumsprozeß der gesamten Knochenstruktur zukommt. Aus der autoradiographischen Untersuchung ergibt sich vielmehr, daß postpartal der Sekundärknorpel selbst nicht mehr wächst, sondern nur noch eine Platzhalterfunktion für die enchondral daraus entstehende Knochenstruktur ausübt. Aus dieser Beobachtung ergibt sich die Frage, wie man anders die Hypertrophie der Knorpelzellen erklären kann, wenn sie nicht durch verstärkte Matrixproduktion zu deuten ist.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

AMPRINO,R.: Autoradiographic research on the ^{35}S - sulfate metabolism in cartilage and bone differentiation and growth. Acta anat. (Basel) 24, 121-163, (1955).

BARGMANN,W.: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 6.Aufl., Georg Thieme: Stuttgart (1967).

BEATTY,M.D., HILLEMANN,H.H.: Osteogenesis in The Golden Hamster. Journal of Mammalogy, 121-134, Vol.31 (1950).

BEVELANDER,G., JOHNSON,P.L.: A histochemical study of the development of membrane bone. Anat.Rec. 108, 1 (1950).

BINGHAM,P.J., RAISZ,L.G.: Bone growth in organ culture: effects of phosphate and other nutrients on bone and cartilage. Calc. Tiss. Res. 14, 31-48 (1974).

BIRKEDAHL-HANSEN,H.: Osteoclastic resorption of ^{3}H - proline labelled bone, dentine and cementum in the rat. Calc. Tiss. Res. 15, 77-80 (1974).

BOYER,Charles C.: Embryology. in: The Golden Hamster, Its biology and use in medical research, edited by Hoffmann,R.A., Robinson,P.F., Magalhaes,H., The Iowa State University Press (1968).

BRASH,J.C.: Some problems in the growth and developmental mechanism of bone. Edinburgh Med. J. 41, 305-319, 363-387, (1934).

BUCHER,O.: Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Medizinischer Verlag Hans Huber, 5.Aufl. (1967).

CAMERON,D.A.: The ultrastructure of bone. in: The bioch. and phys. of bone, edited by Bourne,G.H., Academic Press, New York, London (1972).

CARNEIRO,J. and LEBLOND,C.P.: Role of osteoblasts and odontoblasts in secreting the collagen of bone and dentine, as shown by radioautography in mice given tritium-labelled glycin. Exp.cell.res. 18, 291-300, (1959).

CARNEIRO,J.: Syntheses and turn over of collagen in peridontal tissues. in: The use of radioautography in investigating protein syntheses, edited by Leblond,C.P. and Warren, K.B., Academic Press, New York, London (1965).

DZIEWIATKOWSKIE, D.D., BENESCH, R.F. and BENESCH, R.: On the possible utilization of sulfate sulfur by the suckling rat for the synthesis of chondroitin sulfate as indicated by the use of radioactive sulfur. J. Biol. Chem. 178, 931 (1949).

DZIEWIATKOWSKIE, D.D.: Autoradiographic studies of bone growth with ^{35}S - sulfate. in: Symposion on radioisotopes and bone. Blackwell, Sc. Publ. Oxford (1962).

ENGSTRÖM, A.: Aspects of the molecular structure of bone. in: The bioch. and phys. of bone, edited by Bourne, G.H., Academic Press, New York, London (1972).

GARDNER, E.: Osteogenesis in the human embryo and fetus. in: The bioch. and phys. of bone, edited by Bourne, G.H., Academic Press, New York, London (1972).

GREULICH, R.C.: An autoradiographic study of organically bound carbon-14 in growing epiphyseal cartilage and bone. J. bone joint surg. 38, 611 (1956).

GREULICH, R.C. and SLAVKIN, H.C.: Aminoacid utilization in the synthesis of enamel and dentin matrices as visualized by autoradiography. in: The use of radioautography in investigating protein synthesis, edited by Leblond, C.P. and Warren, K.B., Academic Press, New York, London (1965).

HAM, A.W. and HARRIS, W.R.: Repair and transplantation of bone. in: The bioch. and phys. of bone, edited by Bourne, G.H., Second edition vol. III, Academic Press, New York, London (1972).

HAMERMAN, D., ROSENBERG, L.C. and SCHUBERT, M.: Diarthrodial Joints revisited. The Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume, vol. 52-A, 725-774 (1970).

v. HERRATH, E.: Atlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1972).

HERRING,G.M.: The organic matrix of bone. in: The bioch. and phys. of bone, edited by Bourne, G.H., Second edition vol. I, Academic Press, New York, London (1972).

HILDMANN, H.: Die Verwendbarkeit von Knorpel- und Knochentransplantaten in der Mittelohrchirurgie. Eine vergleichende histologische und autoradiographische tierexperimentelle Studie. Habilitationsschrift aus der HNO-Abt. an der RWTH Aachen (1975).

KNESE, K.H.: Struktur und Ultrastruktur des Knochengewebes. in: Handbuch der med. Radiologie, Band IV, Teil 1, herausgegeben von: Diethelen, L., Olsson, O. et al, Springer (1970).

KNESE, K.H.: Struktur und Ultrastruktur des Knorpels. in: Handbuch der med. Radiologie, Band IV, Teil 1, herausgegeben von: Diethelen, L., Olsson,O. et al, Springer (1970).

KOBURG, E.: Autoradiographische Untersuchungen zum Eiweißstoffwechsel der Zellen des Knorpels und des Knochens. Betr. path. Anat. 124, 108-135 (1962).

LANGMAN, J.: Medizinische Embryologie. Georg Thieme Verlag, (1974).

LEBLOND, C.P. and WEINSTOCK, M.: Radioautographic studies of bone formation. in: The bioch. and phys. of bone, edited by Bourne, G.H., Academic Press, New York, London (1972).

LEONHARDT, H.: Histologie und Zytologie des Menschen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1971).

LOW, A.: Further observations on the ossifikation of the human lower jaw. Journal of Anatomy and Physiology, 44, 83-95 (1909).

MAGALHAES, H.: Gross Anatomy. in: The golden hamster, its biology and use in medical research, edited by Hoffman, R.A., Robinson, P.F., Magalhaes, H., The Iowa State University Press (1968).

MORRIS, N.P., FESSLER, L.J., WEINSTOCK, A., FESSLER, J.H.: Procollagen assembly and secretion in embryonic chick bone, J. Biol. Chem. 250, No 14, 5719-26 (1975).

PRITCHARD, J.J.: General histology of bone. in: The bioch. and phys. of bone, edited by Bourne, G.H., Academic Press, New York, London (1972).

PRITCHARD, J.J.: The osteoblast. in: The bioch. and phys. of bone, edited by Bourne, G.H., Academic Press, New York, London, (1972).

RAPPOPORT, S.M.: Medizinische Biochemie. VEB, Volk und Gesundheit, Berlin (1973).

SCHENK, R.K.: Ultrastruktur des Knochens. in: Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 58. Tagung, herausgegeben von Seifer, G., G. Fischer Verlag, Stuttgart (1974).

STARK, D.: Embryologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, (1975).

STEPHENS, C.D.: Development of the middle and the inner ear of the golden hamster. Acta otalaryng, Stockholm, Suppl. 296 (1972).

TONNA, E.A.: Localization and distribution of tritiated histidine in bone and changes concomitant with aging. J. Geront. 16, 392 (1961).

TONNA, E.A., CRONKITE, E.P. and PAVELEC, M.: An autoradiographic study of the localization and distribution of ^{3}H - histidin in bone. J. Histochem. Cytochem., 10, 601 (1962).

TONNA, E.A., CRONKITE, E.P. and PAVELEC, M.: A serial autoradiographic analysis of ^{3}H - glycine utilization and distribution in the femora of growing mice. J. Histochem. Cytochem., 11, 720-733 (1963).

TONNA, E.A.: On the distribution of reduced silver grains in autoradiogramms of bone and cartilage after ^{3}H - aminoacid administration. Lab. invest., 13, 1238, (1964).

TONNA, E.A.: An autoradiographic evaluation of the aging cellular phase of mouse skeleton using tritiated glycin. J. Geront. 19, 198-206 (1964).

TONNA, E.A.: Protein synthesis and cells of the skeletal system . in: The use of radioautography in investigating protein synthesis, edited by: Leblond, C.P. and Warren, K.B., Academic Press, New York, London (1965).

TONNA, E.A. and PAVELEC, M.: An autoradiographic study of ^{3}H - proline utilization by aging mouse skeletal tissues. I Bone Cell Compartments, J. of Gerontology, vol 26, No 3, 310-315 (1971).

TONNA, E.A.: Zellkinetik des Knochen und Altern. in: Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 58. Tagung, herausgegeben von: Seifert, G., Gustav Fischer Verlag (1974).

TONNA, E.A.: Application of the ^{3}H - proline topographic method to dental tissues. J. Peridont. Res., 357-368 (1975).

WALDEYER, A.: Anatomie des Menschen. Walter de Gruyter, Berlin, New York (1974).

WATZKA, M.: Kurzlehrbuch der Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen. Schatthauer Verlag, Stuttgart, New York (1969).

YOUNG, R.W.: Postnatal growth of the frontal and parietal bones in white males. Amer. J. Phys. Anthrop. 15, 367-386, (1957).

YOUNG, R.W.: Autoradiographic studies on postnatal growth of the skull in young rats injected with tritiated glycine. Anat. Rec., 143, 1-13 (1962).

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. H. Hildmann für die freundliche Überlassung des Themas sowie für seine Bereitschaft, mich jederzeit mit Rat und Tat zu unterstützen.

Frau Dorothee Schmidt gilt mein Dank für die freundliche Hilfe bei der technischen Durchführung der Arbeit.

L E B E N S L A U F

Geboren am 26.12.1953 in Rheinhausen als Sohn des Bauingenieur Franz Josef Schmidt und seiner Ehefrau Ursula, geb. Weber.

Von April 1960 bis April 1965 Besuch der katholischen Volksschule, danach Besuch des Städt. Math.-Nat. Gymnasium in Rheinhausen.
Reifeprüfung am 24. Mai 1973

Juli 1973 bis Oktober 1973 Wehrdienst als Sanitätssoldat.

Ab Oktober 1973 Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen.
Oktober 1978 bis Oktober 1979 Praktisches Jahr am Marienhospital in Aachen.
Ärztliches Staatsexamen am 24.1o.1979
Approbation zum Arzt am 8. November 1979

5. November 1979 bis 9. Oktober 1980 Wehrdienst als Stabsarzt.

Seit dem 3. November 1980 ärztliche und wissenschaftliche Weiterbildung bei Herrn Prof. Dr. P. Gedigk, Pathologisches Institut der Universität Bonn.

Seit dem 22.04. 1977 verheiratet mit der Grundschullehrerin Gabriele Schmidt, geb. Kukuk.
9. August 1979 Geburt unseres Sohnes Martin.

Bonn den 20. März 1981